

A miR-193b két egynukleotidos polimorfizmusának meghatározása ováriumtumoros betegek mintáiban

Soltész Beáta¹, Lukács János dr.², Keserű Judit dr.¹,
Szentésiné Szirák Krisztina dr.¹, Penyige András dr.¹,
Póka Róbert dr.², Nagy Bálint dr.¹

Debreceni Egyetem, ÁOK, ¹Humán genetikai Tanszék,
²Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet, Debrecen



Bevezetés: A mikroRNS molekulák rövid, nem kódoló szekvenciák, amelyek a transzkripciót követően szabályozzák a génexpressziót. Fontos szerepük van a tumorok kialakulásában, progressziójában és a kezelés kimenetelét is befolyásolhatják. Az egynukleotidos polimorfizmus (SNP) a leggyakoribb formája a genetikai sokféleségnek. Ez miRNS esetében a génexpresszióban is észlelhető eltéréseket eredményezhet. A miR-193b-t összefüggésbe hozták különböző tumorok kialakulásával és a kezelések eredményességével.

Cél: A miR-193b rs30236 és az rs1649942 polimorfizmus meghatározása egészséges és petefészekrákos nők csoportjában.

Anyagok és módszerek: A vizsgálatokba 76 fő petefészekrákos és 76 fő egészséges személyt vontunk be, tőlük vért vettünk le etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) tartalmazó csövekbe. A DNS-t szilika adszorpcióval izoláltuk ki, majd a miR-193b (rs30236 és rs1649942) SNP-ire kifejlesztett LightSnip kit segítségével meghatároztuk a PCR során keletkezett termékek olvadási pontjait LightCycler 96 készülék segítségével. Megállapítottuk az allél és a genotípus előfordulási gyakoriságokat, az adatok statisztikai kiértékeléséhez χ^2 -négyzet tesztet alkalmaztunk.

Eredmények: Az olvadási görbeanalízis során a miR-193b rs30236 esetében a betegek csoportjában a T-allél 28,29%-ban, a kontrollcsoportban 37,50%-ban fordult elő. A genotípusoknál a kontrollcsoportban a CC 36,84%, a CT 50,00%, a TT 13,16%-ban fordultak elő, míg betegeknél 50,00%; 43,42% és 6,58%-ban. Az rs1649942 esetében a betegek csoportjában a C-allél 30,26%-ban, a kontrollcsoportban 22,00%-ban fordult elő. A genotípusok a kontrollcsoportban a CC 6,58%, a CT 30,26%, a TT 63,16%-ban mutatkoztak, míg a betegeknél 14,47%; 31,58% és 53,95%-ban. Nem mutatkozott statisztikailag lényeges különbség a két csoport között egyik SNP és a haplotípusok előfordulási gyakorisága között sem.

Következtetések: A miR-193b számos gén kifejeződésére van hatással, felülexpresszált állapotához hozzájárul a rs1649942 polimorfizmus, amely a platinarezisztencia kialakulásában szerepet játszó gének egyik fontos szabályozója. A petefészekrák kialakulásában betöltött szerepének meghatározása, valamint biomarkerként való bevezetése még további összetett vizsgálatokat igényel.

Kulcsszavak: miRNS, miRNS-193b; SNP, génexpresszió, petefészekrák

Determination of two single nucleotide polymorphisms on miR-193b in samples of ovarian cancer patients

Objective: MicroRNA molecules are short non-coding sequences which play a role in the regulation of gene expression. They have pivotal role in the development of tumors and in their progression. Potentially, they could be used to monitor efficacy of certain treatment modalities. Single nucleotide polymorphism (SNP) is the most common form of genetic variability. It could be observed in miRNAs and could result in differences in gene expression. Polymorphism of miR-193b was shown to be related to several types of tumors.

Aim: Our investigations aimed to determine miR-193b rs30236 and rs1649942 polymorphisms in ovarian cancer patients and controls.

Levelezési cím:

Dr. Nagy Bálint, 4032 Debrecen, Egyetem tér 1.

E-mail: nagy.balint@med.unideb.hu

Materials and methods: 76 ovarian cancer patients and 76 matched controls were included in the study. Blood samples were drawn into EDTA tubes and DNA was isolated by silica adsorption method. Mir-193b rs30236 and rs1649942 were determined by using LightSnip kit and we used melting curve analysis for allele classification. Chi-square test was used for statistical evaluation of the data.

Results: Based on melting curve analysis of miR-193b rs30236 we found 37.50% T allele frequency in the patients' group and 28.29% in the control group. We detected CC genotype in 36.84%, CT genotype in 50.00% and TT genotype in 13.16% of controls while they occurred in 50.00%; 43.42% and 6.58% of the patients, respectively. On analysis of rs1649942 allele C occurred in 30.26% of patients and in 22.00% of controls. CC, CT and TT genotypes occurred with 6.58%, 30.26% and 63.16% frequency among controls, while they were detected with 14.47%; 31.58% and 53.95% frequency among patients, respectively. Statistical analysis of the data did not show significant differences in both SNPs.

Conclusion: The miR-193b has effect on the expression of several genes. The rs1649942 polymorphisms has effect on the development of platinum resistance, as this is the main regulator of genes that are involved in the development of drug resistance. To find out the exact role and suitability of this SNP for use as biomarker in the ovarian cancer prior to chemotherapy more detailed studies are needed.

Keywords: miRNA, miR-193b; SNP, genexpression, ovarian cancer

Bevezetés

A mikroRNS-ek a rövid nem kódoló RNS-molekulák közé tartoznak, amelyek fehérjét nem kódolnak, de fontos szerepet játszanak a génexpresszió szabályozásában [1]. A miRNS-193b-t több tumor kialakulásával hozták összefüggésbe, egyes esetekben tumorszuppresszorként, más esetekben onkogénként működik. Rauhala és munkatársai prosztatarákban vizsgálták a szerepét és bizonyították, hogy a miR-193b alacsony expresszióját ebben a tumorban a gén promotor szakaszának metilációs epigenetikai módosítása eredményezi [2]. Bőr, vastagbél és fej-nyakrák esetében is kimutatták a szabályozó funkcióját [3]. Yong és munkatársai írták le először a miR-193a-3p eltérő expresszióját colorectalis daganatokban 2013-ban, de a szabályozás pontos mechanizmusát még nem tárták fel, további vizsgálatokat terveznek [4]. Legutóbbi vizsgálatok során kissejtes tüdőrákban tanulmányozták, és a túléléssel találtak összefüggést, ahol a terápiában a petefészekrákhoz hasonlóan a platinakezelés a leggyakrabban alkalmazott módszer [5].

A petefészekrák a 8. leggyakrabban előforduló tumor a nők között az iparilag fejlett országokban a 2014-es adatok alapján. A leggyakoribb formája az epitheliális típus, ez az esetek közel 95%-át teszi ki. A korai diagnózist nehezíti, hogy a tünetek nem elég specifikusak. Annak ellenére, hogy az operatív beavatkozások és a kemoterápia jelentősen fejlődtek az elmúlt években, a betegség prognózisa összességében még mindig rossz és az 5 éves túlélés 50% alatt van [6].

Nagy szükség lenne olyan biomarkerekre, amelyek korai stádiumban jeleznék az petefészekrák kialakulását, illetve kiújulását. Ezek lehetővé tennék a hagyományos eljárásoknál jóval korábbi kimutatást, valamint alkalmasak lennének a kezelések monitorizálására, esetleg annak a meghatározására, hogy egyes betegeknél melyik terápia vezetne a legjobb kezelési eredményre. Erre alkalmasnak tűnnek a miRNS-molekulák. Az irodalmi adatok a miRNS polimorfizmusok szerepét összefüggésbe hozták a petefészekrák kialakulásával. Az adatok főleg a kínai kutatócsoportoktól erednek,

kaukázusi populációból kevés adat áll rendelkezésre [7]. A miRNS-molekulák laboratóriumi szempontból ideálisak, jól bírják a hűtést, felolvasztást, a pH változását és nem bomlanak le könnyen.

Célkitűzésünk volt, hogy a betegektől és a kontroll egészségesektől levett EDTA-s vérmintákból izolált DNS-ből valósidejű PCR-t követően olvadási görbeanalízist végezzünk és meghatározzuk az egyes allél és genotípus előfordulási gyakoriságokat és ezekkel, valamint a petefészekrák megjelenésével összefüggést keressünk. A gén szerepének vizsgálatára hálózatkutatást terveztünk.

Anyagok és módszerek

Betegek

A vizsgálatba bevont személyeket két csoportba soroltuk, egészséges kontroll (n=76; átlagos életkor 60,22 év) és ováriumtumorban szenvedők (n=76; átlagos életkor 58,84 év). A betegek FIGO-besorolása 49 esetben készült el, a többiekénél még folyamatban van. A besorolás megoszlása a következő volt: Ia 8 fő, Ic 10 fő, IIb 1 fő, IIc 1 fő, IIIb 4 fő, IIIc 20 fő, IV 4 fő. A tumoros esetek sporadikus megjelenésűek voltak. A BRCA1- és BRCA2-gének mutációjának meghatározásai nem történtek meg. Az ETT TUKEB engedélyezte a tanulmányt, a vizsgálatok lényegéről tájékoztattuk az érintetteket, akik beleegyező nyilatkozatot írtak alá.

SNP-meghatározás

A vizsgálati személyektől 9 ml EDTA-s vér levétele után 200 mikroliter vérből DNS-izolálás történt szilika adszorpciós módszerrel, a gyártó utasításai szerint (High Pure PCR Template Preparation kit, Roche, Mannheim, Németország) [8]. A kvantitatív valósidejű PCR során egy mikroliter DNS-t, egy mikroliter LightSnip keveréket, 3,0 mM MgCl₂-t és egy mikroliter LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes keveréket (Roche, Penzendorf,

1. táblázat. A miR-193b rs30236 allél és genotípus gyakoriságok a vizsgált csoportokban

Allélok		
miR-193b rs30236	C	T
Kontroll (n=76)	95 (62,50%)	57 (37,50%)*
Beteg (n=76)	109 (71,71%)	43 (28,29%)

*khí2 próba p=0,0874

Genotípusok			
miR-193b rs30236	CC	CT	TT
Kontroll (n=76)	28 (36,84%)	38 (50,00%)	10 (13,16%)*
Beteg (n=76)	38 (50,00%)	33 (43,42%)	5 (6,58%)

*khí2 próba p=0,1708

2. táblázat. A miR-193b rs1649942 allél és genotípus gyakoriságok a vizsgált csoportokban

Allélok		
miR-193b rs1649942	C	T
Kontroll (n=76)	33 (22,00%)	117 (78,00%)*
Beteg (n=76)	46 (30,26%)	106 (69,74%)

*khí2 próba p=0,1825

Genotípusok			
miR-193b rs1649942	CC	CT	TT
Kontroll (n=76)	5 (6,58%)	23 (30,26%)	47 (63,16%)*
Beteg (n=76)	11 (14,47%)	24 (31,58%)	41 (53,95%)

*khí2 próba p=0,2439

Németország) mértünk be a PCR-elegyhez 10 µl végtérfo-
gatba. A LightSnip primereket a TibMolbiol (Berlin,
Németország) tervezte meg és gyártotta le a miR-196a-5p-n
található rs30236 és rs1649942 SNP-re. A PCR során a 10
perces denaturációt követően 36 ciklusban történt a termé-
kek megsokszorozása 60 C°-os annealinggel. Az ampli-
fikációt olvadási görbe analízis követte. Az rs30236 esetében
a T-allél 54 C°-os, a C allél 65 C°-os; az rs1649942 esetében
a C-allél 54 C°-os, a T-allél 62 C°-os Tm-mel mutatkozott a
meghatározások során.

Bioinformatikai analízis (hálózatkutatás)

A has-miR-193b-3p mikroRNS célgénjeinek meghatáro-
zásához a TargetScan (www.targetscan.org), MirBase
(www.microrna.sanger.ac.uk) és a microRNA-Data-
Integration-Portal (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP>)

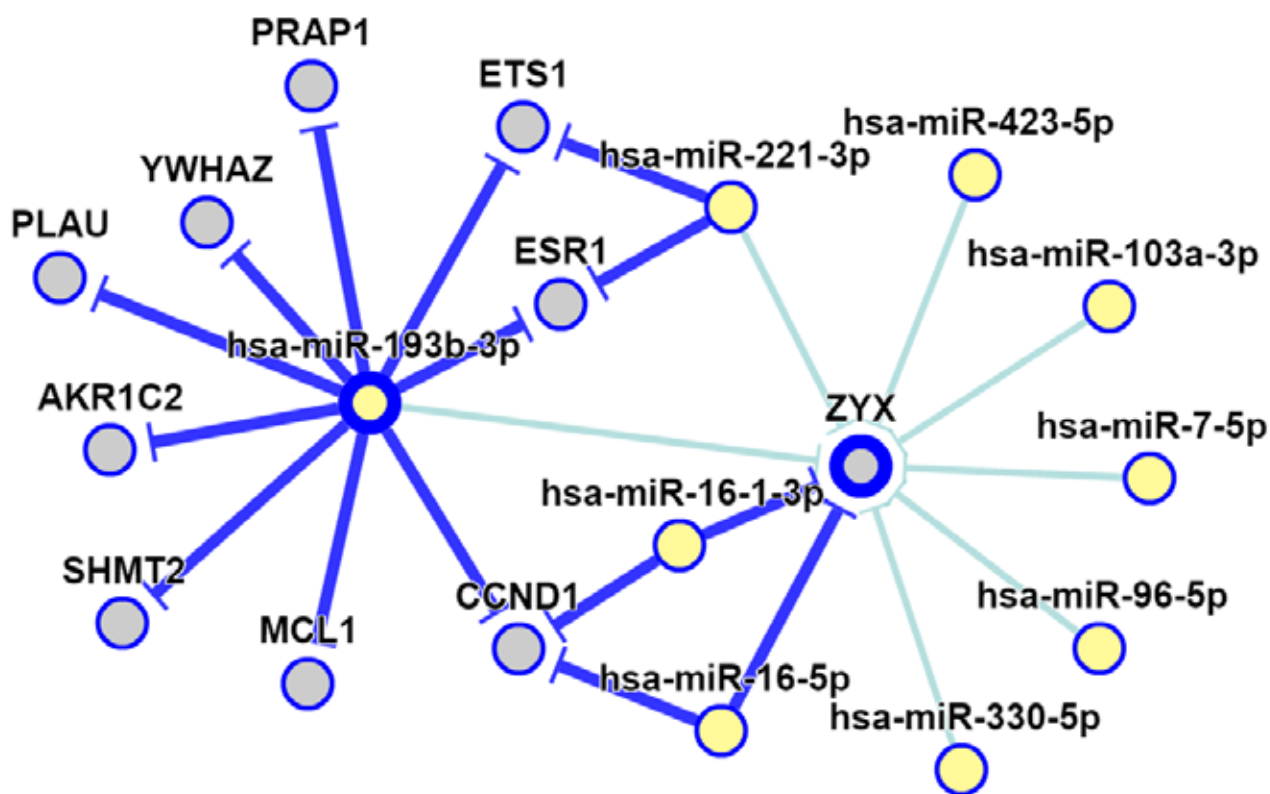
**3. táblázat. A haplotípusok előfordulása a két vizs-
gált csoportban**

Haplotípus rs30236- rs1649942	Ováriaumtumoros betegek (n=76)	Kontrollcsoport (n=76)
CC CC	8 (10,5%)	0 (0,0%)
CC CT	11 (14,5%)	10 (13,2%)
CC TT	21 (27,6%)	20 (26,3%)
CT TT	14 (18,4%)	24 (31,6%)
TT TT	4 (5,3%)	5 (6,6%)
CT CT	13 (17,1%)	8 (10,5%)
CT CC	4 (5,3%)	5 (6,6%)
TT CT	1 (1,3%)	4 (5,2%)

**4. táblázat. A miR-193b-3p célgénjei és az igazolási
módszerek**

Célgén	Reporter assay	Western blot	qRT- PCR	Microarray
CCND1	x	x	x	x
ESR1	x			x
PLAU	x	x	x	x
PRAP1	x	x		
MCL1	x	x	x	x
ETS1		x	x	
YWHAZ			x	
SHMT2			x	x
AKR1C2			x	
CHDH			x	
SGOL1			x	x
CENPJ			x	x
SHMT1			x	x
KIF22			x	x
OIP5			x	x
NCAPH2			x	x
DLX1			x	x
EPPK1			x	x
BASP1			x	
MCCC2			x	
SYNE2			x	
CCP110			x	x
PDXDC1			x	x

predikciós adatbázisokat és az ezek által felkínált algorit-
musokat használtuk fel. A pontos target felismeréséhez
használtunk softwareket a miRNS „mag (seed)” szekvencia és a
mRNS-szekvenciájának komplementaritása mellett a
magszekvencia környezetét és evolúciós konzerváltságát is
figyelembe vesszük.



1. ábra. Hsa-miR-193b-3p főbb célgénjeinek hálózati sémája (forrás: miRTarbase)

A hsa-miR-193b-3p mikroRNS és a főbb célgének közötti kölcsönhatások hálózati sémája kiegészítve a célgénekre ható egyéb mikroRNS-ek kapcsolatrendszerével. A vastagabb vonalak kísérletesen igazolt kölcsönhatásokat, a halványabb vonalak szekvencia alapján predikált kapcsolatokat jelölnek. A hálózatot a miRTarbase adatbázis felhasználásával készült.

Statisztikai analízis

A kategorikus változók gyakoriságának összehasonlítására χ^2 -négyzet tesztet használtunk (allél és a genotípus gyakoriságok) (www.socstatistics.com/tests/chisquare2). A Hardy-Weinberg-törvénynek való megfelelés kiszámítására szabadon hozzáférhető programot alkalmaztunk.

Eredmények

Munkánk során módszert vezettünk be a miRNS-193b két egynukleotidos polimorfizmusának meghatározására. Az alkalmazott PCR-körülmények alkalmasak voltak az egyes allélok olvadási pont szerinti megbízható elkülönítésére. Vizsgálataink során két miRNS SNP előfordulási gyakoriságát határoztuk meg 76 egészséges és 76 petefészekrákos beteg mintáiban. A két csoport átlagos életkorában nem volt lényeges eltérés. Az 1. táblázat mutatja az rs30236 allél- és genotípus előfordulási gyakoriságát. A betegek csoportjában a T-allél 28,29%-ban, a kontrollcsoportban 37,50%-ban fordult elő ($p=0,0874$). A genotípusok a kontrollcsoportban a CC 36,84%, a CT 50,0%, a TT 13,16%-ban fordultak elő, míg betegeknél 50,00%; 43,42% és 6,58%-ban ($p=0,1708$). Az rs1649942 esetében a betegek csoportjában a C-allél 30,26%-ban, a kontrollcsoportban 22,00%-ban fordult elő ($p=0,1825$). A genotípusok a kontrollcsoportban a CC 6,58%, a CT 30,26%, a TT 63,16%-ban fordultak elő, míg a betegeknél 14,47%; 31,58% és 53,95%-ban ($p=0,2439$) (2. táblázat). Érdekes módon CC-genotípus több mint kétszer gyakrabban fordult elő az ováriumtumoros betegek mintái-

ban. A 3. táblázat a haplotípusok előfordulási gyakoriságát mutatja, a CT TT gyakrabban fordul elő a kontrollcsoportban (31,6% vs. 18,4%), de a többinél nem mutatkozik nagyobb eltérés. A betegeknél 5 platinarezisztens esetet találtunk, náluk 3 fő CT TT, egy fő CT CT- és egy CT CC-fenotípusának bizonyult.

Az esetszám növelésével várható, hogy a statisztikai kiértékelésnél lényeges különbségek mutatkoznak.

A hálózatkutatás eredményének az összefoglalását, a legfontosabbnak tűnő géneket a 4. táblázat és az 1. ábra mutatja, amelyeket a miR-193b szabályozza, valamint azokat az igazolási módszereket, amelyekkel ezt megerősítették. A cyclinD1 (CCND1), az ösztrogén receptor (ESR1), a plazminogén aktivátor (PLAU), a prolin rich acidic protein (PRAP1) és a myeloid cell leukemia sequence (MCL1) génekre kifejtett hatását igazolták a legtöbb módszerrel.

Az 1. ábra a miR-193b legfontosabb génkapcsolatait ábrázolja hálózati formájában.

Megbeszélés

A tumoros megbetegedések számának a növekedése új diagnosztikai, terápiás és monitorizálási lehetőségek fejlesztésére kényszeríti a klinikusokat és a kutatókat. A mikroRNS-molekulák az utóbbi néhány évben kerültek a figyelem középpontjába. Ezek a humán genom kb. 1-2%-át teszik ki és fontos szerepük van a sejtproliferációban, a sejtciklus szabályozásában, a differenciációban, az apoptózisban és még számos élettani folyamatban [9]. A tumorkialakulásában tumorszuppresszorként és onkogénként is viselkedhetnek,

például a miR-17-92 felülexpresszált B-sejtes lymphomában, tüdőrákban, a miR-21 vastagbélrákban [10, 11, 12]. A let-7 család tagjai viszont alulexpresszáltak több tumorban és a célmolekulájuk a RAS [13].

A petefészekrák a női reprodukív rendszer második leggyakoribb tumora, az 5. helyen szerepel a tumorok által okozott halálozási statisztikákban. Az esetek 70%-a késői stádiumban kerül felderítésre. A túlélési statisztikák is évek óta stagnálnak a korszerű kezelések ellenére [14]. Amennyiben sikerül korán diagnosztizálni, akkor az 5 éves túlélés elérheti a 90%-ot. Ellenben azok a betegek, akik III., vagy IV. stádiumban vannak, a legmodernebb kezelések, a műtét és az azt követő kemoterápia ellenére is kevesebb, mint 50%-os túlélési arányt érnek el [6]. A korai kimutatást célozzák meg a különböző biomarkerek bevezetése a diagnosztikába. Ezek között szerepelnek alkalmas molekulaként a mikroRNS-ek. A génexpressziók meghatározása mellett a génpolimorfizmusok (SNP-k) meghatározása is biztató eredményekkel szolgál. Az utóbbiak közül a miR-193b polimorfizmusairól jelent meg néhány tanulmány és összefüggést találtak a platinakezelés hatékonyságával [2, 7].

Ezért döntöttük el, hogy meghatározzuk magyar egészséges és petefészekrákos betegek populációjában a miR-193b két polimorfizmusát. Ennek érdekében valós idejű PCR-módszert állítottunk be, és olvadási görbeanalízissel meghatároztuk a két vizsgálandó SNP előfordulási gyakoriságát. Az alkalmazott technikával, biztonsággal állapítottuk meg a mintákból izolált DNS-ben jelen lévő allélokat. Statisztikai analízissel hasonlítottuk össze az allél és genotípus gyakoriságokat.

A miR-193b gén rs30236 SNP polimorfizmusát még nem vizsgálták petefészekrákos betegekben. Szinte alig található irodalmi adat ezzel az SNP-vel kapcsolatban. Egyedül a Reference SNP Cluster Reportban (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) van információ az allélok előfordulási gyakoriságáról, amely szerint az európai populációban a T-allél 43%, a C-allél 56,76%-ban fordul elő 1008 személyt vizsgálva. Ez a mi adatainktól kissé eltér, de nem tudni melyik országból származnak a minták és nem a „kaukázusi”, hanem az „európai” megnevezést használják [16]. A T-allél afrikai-amerikai populációban fordul elő legalacsonyabb számban (30%) (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP_ref). A statisztikai analízis a saját eredményeink összehasonlítása során nem mutatott szignifikáns összefüggést a két csoport között ($p=0,0874$). Nagyobb esetszám szükséges az összefüggés pontosabb megállapítására.

A miR-193b rs1649942 esetében Huang és munkatársai által közölt adatok a genotípusoknál TT 64,19% TC 30,24% és CC 5,57% mutatkoznak, közel megegyeznek az általunk találtakkal, TT 63,16%, TC 30,26% és a CC 6,58%, annak ellenére, hogy ők Ausztráliában gyűjtött 377 beteg mintáit elemezték ki [9]. A C-allél legalacsonyabb előfordulása afrikai és ázsiai populációkban figyelhető meg (16-17%) (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP_ref). A statisztikai analízis a saját adataink elemzése során nem mutatott lényeges eltérést a vizsgált két csoport között ($p=0,2439$). Ezt az SNP-t ellenben többet vizsgálták és lényeges szerepet tulajdonítanak neki a platinarezisztencia kialakulásában. Ziliak és munkatársai LCL és NCI-60 sejtvonalakon tanulmányozták

és 18 gén expressziójával találtak lényeges összefüggést carboplatin kezelés során, ezek között szerepelt az ALDH2, a KYNU, a CRIM1 és az IFIT2 [7]. A miR-193b felülexpressziója specifikus volt a platinakezelésekre, csökkent CRIM1-szintekkel és megnövekedett carboplatin- és ciszplatin-rezisztenciával járt együtt limfoblaszt sejtvonalon [7]. Huang és munkatársai hasonló megfigyeléseket közölt in vitro elvégzett kísérletei során [17], valamint Gumazon és munkatársai összehasonlító genom vizsgálataik során számos gén expressziójának főszabályozójának találták [18]. A Hardy–Weinberg-törvény érvényesnek mutatkozott a két vizsgált SNP-analízise során.

A bioinformatikai analízis során kapott eredmények azt mutatják (4. táblázat és 1. ábra), hogy a miR-193b szabályozása alatt álló gének közül az egyik legfontosabb a CCND1, amely a CDK (ciklin-dependens kináz) működését szabályozza, mutációi, túltermelése a tumor kialakulásához vezet. Dai és munkatársai kimutatták, hogy a ciszplatin gátolhatja a CCND1 expresszióját humán epheliális sejteken [19]. Az ösztrogén receptorok (ESR1) a petefészek epithelium növekedését és differenciálódását szabályozzák, egyes kutatók a petefészekrák prognosztikus faktoraként biomarkerként is számításba veszik [20]. Havrilesky és munkatársai markereket kutatva az alkalmas proteineket vizsgálva három csoportot különített el, a sejtosztódás hormonális szabályozói, az extracelluláris mucinok, és a proteolitikus, koagulációs, fibrinolitikus utakat szabályozók, az utóbbiak közé tartozik a PLAU [21]. A PRAP1-et a rákos sejtek növekedésével hozták összefüggésbe, egy legutóbbi tanulmány a p53 aktivációjában betöltött szerepét vizsgálva a rákos sejtek túlélésének fontos szabályozójaként határozták meg [22]. Az MCL1 a BCL-2 antiapoptotikus hatású fehérjék közé tartozik, a gén a szabályozására mikroRNS-molekulák erősen hatnak, a kemoterápia során kifejlődő rezisztencia kialakulásában lényeges szerepe van [23]. A többi gén, amelyre a miR-193b hatással van szintén számos élettani folyamat meghatározó eleme.

A vizsgált két miR-193b SNP közül az irodalmi adatok alapján is az rs1649942 jelzi előre a platina-érzékenységet. Ez a polimorfizmus a gén fokozott expresszióját idézi elő. A miR-193b számos olyan génre van hatással, amelyek a platina-rezisztencia kialakulását idézik elő. További miRNS SNP-meghatározások eredményei lehetővé tennék olyan panelek kialakítását, amelyeket meghatározva a petefészekrákos betegek részére már a kezelések megkezdése előtt, felhívják a figyelmet, hogy milyen kemoterápia vezetne sikerre az adott beteg esetében. Tanulmányunkat nagyobb beteganyagokon végzett vizsgálatokkal és több SNP-t bevonva folytatjuk a jövőben.

IRODALOM

1. Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ, et al. The long and short of microRNA. *Cell* 2013; 153: 516–519.
2. Rauhalo HE, Jalava SE, Isotalo J, et al. miR-193b is an epigenetically regulated putative tumor suppressor in prostate cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 1363–1372.
3. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 1424–1429.
4. Yong LF, Law WC, Wang WC. Potentiality of triple microRNA classifier: miR-193a-3p, miR-23a and miR-339-5p for early detection of colorectal cancer. *BMC Cancer* 2013; 13: 280.
5. Hu Z, Shu Y, Chen Y, et al. Genetic polymorphisms in the precursor microRNA

flanking region and non-small cell lung cancer survival. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 641–648.

6. Nakamura K, Sawada K, Yoshimura A, et al. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in ovarian cancer. *Mol Cancer* 2016; 15: 48. DOI 10.1186/s12943-016-0536-0

7. Ziliak D, Gamazon RE, LaCroix B, et al. Genetic variation that predicts platinum sensitivity reveals the role of miR-193b in chemotherapeutic susceptibility. *Mol Cancer Ther* 2012; 11: 2054–2061.

8. Nagy B, Bán Z, Papp Z. The DNA isolation method has effect on allele drop out and on the results of fluorescent PCR and DNA fragment analysis. *Clin Chim Acta* 2005; 360: 128–132.

9. Huang RS, Johnatty ES, Gamazon RE, et al. Platinum sensitivity-related germline polymorphism discovered via a cell-based approach and analysis of its association with outcome in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 5490–5500.

10. Torres A, Torres K, Maciejewski R, et al. MicroRNAs and their role in gynecological tumors. *Med Res Reviews* 2011; 31: 895–923.

11. He L, Thompson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435: 828–833.

12. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *J Am Med Assoc* 2008; 299: 425–436.

13. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120: 13944–13949.

14. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004; 51: 2519–2529.

15. Jian B, Li Z, Xiao D, et al. Downregulation of microRNA-193-3p inhibits tumor

proliferation migration and chemoresistance in human gastric cancer by regulating PTEN gene. *Tumor Biol* 2016; 37: 8941–8949.

16. Reference SNP Cluster Report (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>)

17. Huang RS, Duan S, Shukla SJ, et al. Identification of genetic variants contributing to cisplatin-induced cytotoxicity using genome-wide approach. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 427–437.

18. Gumazon ER, Huang RS, Cox NJ, et al. Chemotherapeutic drug susceptibility associated SNPs are enriched in expression quantitative trait loci. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 9287–9292.

19. Dai J, Wei R-J, Li R, et al. A study of CCND1 with epithelial ovarian cancer cell proliferation and apoptosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; 20: 4230–4235.

20. Zamagni C, Wirtz MR, De Iaco P, et al. Osetrogen receptor a mRNA is a prognostic factor in ovarian cancer patients treated with neo-adjuvant chemotherapy: determination by array and kinetic PCR in fresh tissue biopsies. *Endocrine-Related Cancer* 2009; 16: 1241–1249.

21. Havrilesky JL, Whitehead MC, Rubatt MJ, et al. Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence. *Gynecol Oncol* 2008; 110: 374–382.

22. Huang HB, Zhuo LJ, Leung WHC, et al. PRAP1 is a novel executor of p53-dependent mechanisms in cell survival after DNA damage. *Cell Death and Disease* 2012; 3: e442 doi:10.1038/cddis.2012.180

23. Sugio A, Iwasaki M, Habata S, et al. BAG3 upregulates MCL-1 through down-regulation of miR-29b to induce anticancer drug resistance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2014; 134: 615–623.